

J1017 U.S. PRO
09/903770
07/13/01



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bettina MOECKEL et al

SERIAL NO: New U.S. Application

FILED: Herewith

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR THE lysR1 GENE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

| COUNTRY | APPLICATION NUMBER | MONTH/DAY/YEAR |
|----------------|---------------------------|-----------------------|
| GERMANY | 100 39 044.7 | AUGUST 10, 2000 |

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- is submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
 - are submitted herewith
 - will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Daniel J. Pereira, Ph.D.
Registration No. 45,518



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



J1017 U.S. PTO
09/903770
07/13/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 39 044.7
Anmeldetag: 10. August 2000
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE
Bezeichnung: Neue für das lysR1-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen
IPC: C 07 H, C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 07. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weber

DR. H. WEBER

Neue für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren,
5 insbesondere L-Lysin, durch Abschwächung des lysR1-Gens. Das lysR1-Gen kodiert für das LysR1-Protein, welches ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie ist.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der

10 Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere

15 Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die
20 Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst
25 betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph
30 für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure-produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

10 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 15 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR1 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine

30 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
 - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind:

- 10 eine replizierbare DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;
- ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;
- 15 ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, Punkt d, insbesondere pCR2.1lysR1int, hinterlegt in E.coli DSM 13616 bei der DSMZ, Braunschweig (Deutschland);
- und coryneforme Bakterien, die in dem lysR1-Gen eine Insertion oder Deletion, insbesondere unter Verwendung des Vektors pCR2.1lysR1int, enthalten.
- 20 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung
- 25 einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das LysR1-Protein 5 kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des lysR1-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-10 Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das LysR1-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende 15 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf 20 Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene 25 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des LysR1-Proteins und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und 30 besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen 5 die für das lysR1-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der 10 intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer 15 niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin 20 aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art 25 Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind 30 besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

5 oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-
Lysin produzierenden Stämme

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
10 Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1
Corynebacterium glutamicum DG52-5
15 Corynebacterium glutamicum DSM 5714 und
Corynebacterium glutamicum DSM 12866

Den Erfindern gelang es, das neue, für das lysR1-Protein
kodierende lysR1-Gen von C. glutamicum, welches ein
Transkriptionsregulator der LysR-Familie ist, zu isolieren.

20 Zur Isolierung des lysR1-Gens oder auch anderer Gene von C.
glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das
Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel
25 seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
30 ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et
al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ-Vektoren angelegt wurde.
Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265,
1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032,
die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,

1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
5 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pHC79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life
10 Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirsche eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 α (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial
15 Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend
20 wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467,
25 1977) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder
30 dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das lysR1-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No.

1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin
wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben
beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des
entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die
5 sich ergebende Aminosäuresequenz des lysR1-Genproduktes
dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch
die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind
ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind
10 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID
No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der
Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche
wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von
Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als
15 „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner
grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins
führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt,
daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins
dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar
20 stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann
unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of
Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene
77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences
3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology
25 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der
Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die
sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind
ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung,
30 die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter
Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ
ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben
typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels
35 Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im

Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des lysR1-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

- 15 Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des lysR1-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.
- 20 Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren,
- 25 Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers
- 30 („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,
- 35

Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der 5 katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 10 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydrolase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülich, JüL-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen 15 können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, 20 Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens 25 einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen 30 Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, 35 Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und

Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu 5 mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung (gene disruption) und des Gen-Austauschs (gene replacement).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler 10 Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob 15 (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994)). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt 20 (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird 25 anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind 30 beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"- 35 Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens

durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 5 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C. glutamicum verwendet.

In Figur 1 ist beispielhaft der Plasmidvektor pCR2.1 lysR1int gezeigt, mit Hilfe dessen das lysR1-Gen unterbrochen bzw. ausgeschaltet werden kann.

- 10 Bei der Methode des Genaustausches (gene replacement) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und 15 dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses 20 im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von C. glutamicum durch eine Deletion auszuschalten.
- 25 In das lysR1-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des lysR1-Gens eines oder mehrere Enzyme des 30 jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphat-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydridopicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),
- das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Außerdem kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des lysR1-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114)

abzuschwächen.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des lysR1-Gens unerwünschte Nebenreaktionen

auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sickyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- 5 Die erfundungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfundung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
- 10 zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.
- 15

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen

- 20 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose,
- 25 Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.
- 30

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff

- 35 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,

Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,
- 5 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.
- 10 Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen
- 15 Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie
- 20 Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende
- 25 Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei
- 30 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

- Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem
- 35 Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so

wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei
5 Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- 10 • Escherichia coli Stamm E.coli TOP10F/pCR2.1lysR1int als DSM 13616.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von
15 Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring
20 Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)
durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al.
25 entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus C. glutamicum ATCC 13032

Chromosomal DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei
30 Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben,
isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham

- Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung
Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-
Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche
Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland,
- 5 Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
- 10 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
dephosphoryliert.
- 15 Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
- 20 DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.
- 25 Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.
1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in
10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der
Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der
- 30 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular
Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor)
beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
(Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin
ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C
35 wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens lysR1

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, 5 Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular 10 Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, 15 Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, 20 Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA- 25 Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et 30 al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 912 Basenpaaren, welches als lysR1-Gen bezeichnet wurde. Das lysR1-Gen kodiert für ein Polypeptid von 304 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des lysR1-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomal DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für C. glutamicum bekannten Sequenz des lysR1-Gens wurden die 5 folgenden Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion ausgewählt:

lysR1intA:

5`TTC CAA TCC CTG CTG TTC AC 3`

lysR1intB:

10 5`GTG ACC TTT GAA ACC AGC GA 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) 15 mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein 383 bp großes internes Fragment des lysR1-Gens isoliert, welches in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA 20 Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

Anschließend wurde der E. coli Stamm TOP10F mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA Cloning. A Practical 25 Approach. Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring 30 Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und

anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft.
Das Plasmid wurde pCR2.1lysRlnt genannt.

Beispiel 4

Integrationsmutagenese des lysRl-Gens in dem

5 Lysinproduzenten DSM 5715

Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1lysRlnt wurde nach
der Elektroporationsmethode von Tauch et.al. (FEMS

Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in

Corynebacterium glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem

10 Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten

Lysin-Produzenten. Der Vektor pCR2.1lysRlnt kann in DSM

5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in

der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715

integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom

15 integriertem pCR2.1lysRlnt erfolgte durch Ausplattieren

des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al.,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit

15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

20 Für den Nachweis der Integration wurde das lysRlnt-

Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for

Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH

(Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-

Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.

25 Chromosomal DNA eines potentiellen Integranten wurde nach

der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 -

1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den

Restriktionsenzymen SalI, SacI und HindIII geschnitten. Die

entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese

30 aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma

Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3

genannte Plasmid pCR2.1lysRlnt hatte innerhalb des

chromosomalen lysRl-Gens ins Chromosom von DSM 5715

inseriert. Der Stamm wurde als DSM 5715::pCR2.1lysR1int bezeichnet.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin

- 5 Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM 5715::pCR2.1lysR1int wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

15 Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4 eingestellt

Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur

20 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS 20 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 50g/l

Salze:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 g/l

KH_2PO_4 0,1 g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,0 g/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mg/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,0mg/l

Biotin (sterilfiltriert) 0,3 mg/l

Thiamin * HCl (sterilfiltriert) 0,2 mg/l

Leucin (sterilfiltriert) 0,1 g/l

CaCO_3 25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte CaCO_3 zugesetzt.

- 5 Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

- Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 10 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik

(Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustausch-Chromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

5

Tabelle 1

| Stamm | OD(660) | Lysin-HCl g/l |
|--------------------------|---------|------------------|
| DSM 5715 | 7,5 | 13,01 |
| DSM 5715::pCR2.1lysR1int | 7,7 | 15,64 |

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000172 BT

<140>

10 <141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1311

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>

<221> CDS

<222> (201)..(1109)

<223> lysR1-Gen

25 <400> 1

acagccccagg ggccgttgag ggggaaaagc tgcgttccaa tggcagcacc aaattgcagg 60

gatagggcgg aacccatcac catcaacact gcagcggact gtttattcat gcccttgatt 120

30 attgccaaag aaaccttaa ggactagatc gaaaaacagc caactatagt taagtaatac 180

tgaacaattt tggaggtgtc gtg ctc aat ctc aac cgc tta cac atc ctg cag 233
Met Leu Asn Leu Asn Arg Leu His Ile Leu Gln

35 1

5

10

gaa ttc cac cgc ctg gga acg att aca gca gtg gcg gaa tcc atg aac 281
Glu Phe His Arg Leu Gly Thr Ile Thr Ala Val Ala Glu Ser Met Asn
15 20 25

40 tac agc cgc tct gcc atc tcc caa caa atg gcg ctg ctg gaa aaa gaa 329

Tyr Ser Arg Ser Ala Ile Ser Gln Gln Met Ala Leu Leu Glu Lys Glu
30 35 40

45 att ggt gtg aaa ctc ttt gaa aaa agc ggc cga aac ctc tac ttc aca

Ile Gly Val Lys Leu Phe Glu Lys Ser Gly Arg Asn Leu Tyr Phe Thr
45 50 55

377

50 gaa caa ggc gaa gtg ttg gcc tca gaa aca cat gcg atc atg gca gca

Glu Gln Gly Glu Val Leu Ala Ser Glu Thr His Ala Ile Met Ala Ala
60 65 70 75

425

55 gtc gac cat gcc cgc gca gcc gtt cta gat tcg ctg tct gaa gtg tcc

Val Asp His Ala Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Val Ser
80 85 90

473

gga acg ctg aaa gtc acc tcc ttc caa tcc ctg ctg ttc acc ctt gcc

Gly Thr Leu Lys Val Thr Ser Phe Gln Ser Leu Leu Phe Thr Leu Ala
95 100 105

521

| | | |
|----|---|-----------|
| | ccg aaa gcc atc gcg cgc ctg acc gag aaa tac cca cac ctg caa gta Pro Lys Ala Ile Ala Arg Leu Thr Glu Lys Tyr Pro His Leu Gln Val | 569 |
| | 110 115 120 | |
| 5 | gaa atc tcc caa cta gaa gtc acc gca gcg ctc gaa gaa ctc cgc gcc Glu Ile Ser Gln Leu Glu Val Thr Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg Ala | 617 |
| | 125 130 135 | |
| 10 | cgc cgc gtc gac gtc gca ctc ggc gag gaa tac ccc gtg gaa gtc ccc Arg Arg Val Asp Val Ala Leu Gly Glu Tyr Pro Val Glu Val Pro | 665 |
| | 140 145 150 155 | |
| 15 | ctt gtt gag gcc agc att cac cgc gaa gtc ctc ttc gaa gac ccc atg Leu Val Glu Ala Ser Ile His Arg Glu Val Leu Phe Glu Asp Pro Met | 713 |
| | 160 165 170 | |
| 20 | ctg ctc gtc acc cca gca agc ggc cca tac tct ggc ctc acc ctc cca Leu Leu Val Thr Pro Ala Ser Gly Pro Tyr Ser Gly Leu Thr Leu Pro | 761 |
| | 175 180 185 | |
| | gaa ctc cgc gac atc ccc atc gcc atc gat cca ccc gac ctt ccc gcg Glu Leu Arg Asp Ile Pro Ile Ala Ile Asp Pro Pro Asp Leu Pro Ala | 809 |
| | 190 195 200 | |
| 25 | ggc gaa tgg gtc cat agg ctc tgc cgg cgc gcc ggg ttt gag ccc cgc Gly Glu Trp Val His Arg Leu Cys Arg Arg Ala Gly Phe Glu Pro Arg | 857 |
| | 205 210 215 | |
| 30 | gtg acc ttt gaa acc agc gat ccc atg ctc caa gca cac ctc gtg cgt Val Thr Phe Glu Thr Ser Asp Pro Met Leu Gln Ala His Leu Val Arg | 905 |
| | 220 225 230 235 | |
| 35 | agc ggc ttg gcc gtg aca ttt tcc ccc aca ctg ctc acc ccg atg ctg Ser Gly Leu Ala Val Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Thr Pro Met Leu | 953 |
| | 240 245 250 | |
| 40 | gaa agc gtg cac atc cag ccg ctg ccc ggc aac ccc acg cgc acg ctc Glu Ser Val His Ile Gln Pro Leu Pro Gly Asn Pro Thr Arg Thr Leu | 1001 |
| | 255 260 265 | |
| | tac acc gcg gtc agg gaa ggg cgc cag ggg cat cca gcc att aaa gct Tyr Thr Ala Val Arg Glu Gly Arg Gln Gly His Pro Ala Ile Lys Ala | 1049 |
| | 270 275 280 | |
| 45 | ttt cga cga gcc ctc gcc cat gtg gcc aaa gaa tct tat ttg gag gct Phe Arg Arg Ala Leu Ala His Val Ala Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Ala | 1097 |
| | 285 290 295 | |
| 50 | cgt cta gta gag tgagttcttg tgaggcttca gacaaatcat cgccccagtac Arg Leu Val Glu | 1149 |
| | 300 | |
| 55 | tcgtcggtga cttcgccgca cagtagcgc agctgatcgc acgtcggttg cgtgaggccg gcatactactc cgaagtcatc ccgcacaccg ccaccgcaga cgtatgtgcgc gctaaaaatg | 1209 1269 |
| | cagcagccct cgtccttcc ggtggcccat cctccgtgtat tg | 1311 |

<210> 2
 <211> 303
 <212> PRT
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

| | |
|----|---|
| | <400> 2 |
| | Met Leu Asn Leu Asn Arg Leu His Ile Leu Gln Glu Phe His Arg Leu |
| 10 | 1 5 10 15 |
| | Gly Thr Ile Thr Ala Val Ala Glu Ser Met Asn Tyr Ser Arg Ser Ala |
| | 20 25 30 |
| 15 | Ile Ser Gln Gln Met Ala Leu Leu Glu Lys Glu Ile Gly Val Lys Leu |
| | 35 40 45 |
| | Phe Glu Lys Ser Gly Arg Asn Leu Tyr Phe Thr Glu Gln Gly Glu Val |
| | 50 55 60 |
| 20 | Leu Ala Ser Glu Thr His Ala Ile Met Ala Ala Val Asp His Ala Arg |
| | 65 70 75 80 |
| | Ala Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Val Ser Gly Thr Leu Lys Val |
| | 85 90 95 |
| 25 | Thr Ser Phe Gln Ser Leu Leu Phe Thr Leu Ala Pro Lys Ala Ile Ala |
| | 100 105 110 |
| 30 | Arg Leu Thr Glu Lys Tyr Pro His Leu Gln Val Glu Ile Ser Gln Leu |
| | 115 120 125 |
| | Glu Val Thr Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg Arg Val Asp Val |
| | 130 135 140 |
| 35 | Ala Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Val Glu Val Pro Leu Val Glu Ala Ser |
| | 145 150 155 160 |
| | Ile His Arg Glu Val Leu Phe Glu Asp Pro Met Leu Leu Val Thr Pro |
| | 165 170 175 |
| 40 | Ala Ser Gly Pro Tyr Ser Gly Leu Thr Leu Pro Glu Leu Arg Asp Ile |
| | 180 185 190 |
| 45 | Pro Ile Ala Ile Asp Pro Pro Asp Leu Pro Ala Gly Glu Trp Val His |
| | 195 200 205 |
| | Arg Leu Cys Arg Arg Ala Gly Phe Glu Pro Arg Val Thr Phe Glu Thr |
| | 210 215 220 |
| 50 | Ser Asp Pro Met Leu Gln Ala His Leu Val Arg Ser Gly Leu Ala Val |
| | 225 230 235 240 |
| | Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Thr Pro Met Leu Glu Ser Val His Ile |
| | 245 250 255 |
| 55 | Gln Pro Leu Pro Gly Asn Pro Thr Arg Thr Leu Tyr Thr Ala Val Arg |
| | 260 265 270 |
| | Glu Gly Arg Gln Gly His Pro Ala Ile Lys Ala Phe Arg Arg Ala Leu |

275

280

285

Ala His Val Ala Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Ala Arg Leu Val Glu
290 295 300

5

<210> 3

<211> 383

10 <212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> lysRlint-Fragment

15

<400> 3

ttccaaatccc tgctgttcac ctttgcgg aaaggccatcg cgccgcgtgac cgagaaatac 60

ccacacactgc aagttagaaat ctcccaacta gaagtcaccg cagcgctcga agaactccgc 120

gccccggcgcg tcgacgtcgc actcggcgag gaatacccg tggaaatccc ctttgcgtttag 180

20

gccaggcatc accgcgaagt cctcttcgaa gacccatgc tgctcgatc cccagcaagc 240

ggcccaatact ctggccctcac cttggccagaa ctccgcgaca tcccatcgcatcgatcca 300

cccggaccttc ccgcgggcga atgggtccat aggctctgcc ggccgcgcgg gtttgagccc 360

cgcgtgacct ttgaaaccag cga 383

25

Folgende Figuren sind beigefügt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1lysR1int.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR: Kanamycin Resistenz-Gen

EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI

lysR1int: internes Fragment des lysR1-Gens

ColE1 ori: Replikationsursprung des Plasmids ColE1

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das 10 eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c), wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR1 aufweist.
- 20 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
- 6. Coryneforme Bakterien, in denen das lysR1-Gen abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird.
- 10 7. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt,
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das lysR1-Gen abschwächt,
 - b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 15 20 8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
- 25 9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 30 10. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die Expression des (der) Polynukleotids(e), das (die) für das lysR1-

Gen kodiert (kodieren) verringert, insbesondere ausschaltet.

11. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids herabsetzt, für das das Polynukleotid lysR1 kodiert.

5 12. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, Bakterien fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

10 12.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,

12.2 das für die Enolase kodierende Gen eno,

15 12.3 das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf,

12.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,

12.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE, verstärkt, bevorzugt überexprimiert.

20 13. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

25 13.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,

13.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi,

13.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB abschwächt.

14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen der Art C. glutamicum einsetzt.
- 5 15. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator LysR1 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des lysR1-Gens aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.
10

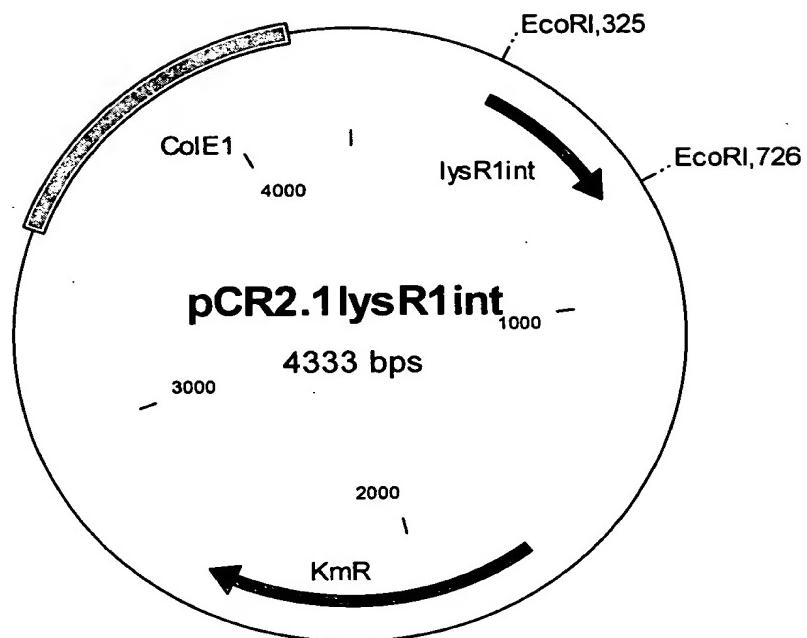
Neue für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen**Zusammenfassung**

Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

20 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das lysR1-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Plasmidkarte von pCR2.1lysR1int



J1017 U.S. PRO
09/903770
07/13/01



TRANSLATOR'S DECLARATION

I, John F. Moloney, BSc., MIL., CChem., MRSC., translator to Taylor & Meyer of 20 Kingsmead Road, London, SW2 3JD, Great Britain, verify that I know well both the German and the English language, that I have prepared the attached English translation of pages of a German Patent application in the German language with the title:

Neue für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

identified by the code number 000179 BT / AL at the upper left of each page and that the attached English translation of this document is a true and correct translation of the document attached thereto to the best of my knowledge and belief.

I further declare that all statements made of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true, and further that these statements are made with the knowledge that wilful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under 18 USC 1001, and that such false statements may jeopardize the validity of this document.

By: J.F. Moloney

Date: 19th March 2001

New Nucleotide Sequences Coding for the lysR1 Gene

The invention provides nucleotide sequences from coryneform bacteria coding for the lysR1 gene and a process for the enzymatic production of amino acids, in particular L-lysine, by attenuation of the lysR1 gene. The lysR1 gene codes for lysR1 protein, which is a transcription regulator of the lysR family.

Prior Art

L-amino acids, in particular L-lysine, are used in human medicine and in the pharmaceutical industry, in the foodstuffs industry, and most particularly in animal nutrition.

It is known that amino acids can be produced by fermentation of strains of coryneform bacteria, in particular Corynebacterium glutamicum. On account of the great importance of these amino acids constant efforts are being made to improve the production processes.

Improvements in production processes may involve fermentation technology measures, such as for example stirring and provision of oxygen, or the composition of the nutrient media, such as for example the sugar concentration during the fermentation, or the working up to the product form by for example ion exchange chromatography, or the intrinsic performance properties of the microorganism itself.

Methods involving mutagenesis, selection and mutant selection are used to improve the performance properties of these microorganisms. In this way strains are obtained that are resistant to antimetabolites or are auxotrophic for regulatorily significant metabolites and that produce amino acids.

For some years recombinant DNA technology methods have also been used to improve strains of Corynebacterium that produce L-amino acids.

Object of the Invention

- 5 The inventors have set themselves the task of developing new procedures for the improved enzymatic production of amino acids, especially L-lysine.

Description of the Invention

The invention provides an isolated polynucleotide of
10 coryneform bacteria containing a polynucleotide sequence coding for the lysR1 gene, selected from the group comprising

- a) polynucleotide that is at least 70% identical to a polynucleotide coding for a polypeptide that contains
15 the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
- b) polynucleotide coding for a polypeptide that contains an amino acid sequence that is at least 70% identical to the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
- c) polynucleotide that is complementary to the
20 polynucleotides of a) or b), and
- d) polynucleotide containing at least 15 successive nucleotides of the polynucleotide sequence of a), b) or c),

the polypeptide preferably having the activity of the
25 transcription regulator lysR1.

The invention also provides the aforementioned polynucleotide, which is preferably a replicable DNA containing:

- (i) the nucleotide sequence shown in SEQ ID No.1, or

- (ii) at least one sequence that corresponds to the sequence (i) within the region of degeneration of the genetic code, or
- 5 (iii) at least one sequence that hybridises with the sequences that are complementary to the sequences (i) or (ii), and optionally
- (iv) functionally neutral sense mutations in (i).

The invention furthermore provides:

a replicable DNA containing the nucleotide sequence as
10 illustrated in SEQ ID No.1;

a polynucleotide coding for a polypeptide that contains the amino acid sequence as is illustrated in SEQ ID No. 2;

a vector containing the polynucleotide d) according to the invention, in particular pCR2.llysRlnt inserted into
15 E. Coli DSM 13616 and filed at DSMZ, Brunswick,
(Germany);

and coryneform bacteria that in the lysR1 gene contain an insertion or deletion, in particular by using the vector pCR2.llysRlnt.

20 The invention thus provides polynucleotides consisting substantially of a polynucleotide sequence, that are obtainable by screening by hybridising a corresponding gene library that contains the complete gene with the polynucleotide sequence corresponding to SEQ ID No.1, with
25 a probe that contains the sequence of the aforementioned polynucleotide according to SEQ ID No. 1 or a fragment thereof, and isolating the aforementioned DNA sequence.

Polynucleotide sequences according to the invention are suitable as hybridisation probes for RNA, cDNA and DNA, in
30 order to isolate nucleic acids, polynucleotides or genes in their full length that code for lysR1 protein, or to

isolate such nucleic acids or polynucleotides or genes that have a high degree of similarity to the sequence of the lysR1 gene.

Polynucleotide sequences according to the invention are 5 furthermore suitable as primers with the aid of which and by means of the polymerase chain reaction (PCR), DNA of genes can be produced that code for lysR1 protein.

Such oligonucleotides serving as probes or primers contain at least 30, preferably at least 20, and most particularly 10 preferably at least 15 successive nucleotides. Also suitable are oligonucleotides having a length of at least 40 or 50 nucleotides.

"Isolated" denotes separated from its natural environment.

"Polynucleotide" refers in general to polyribonucleotides 15 and polydeoxyribonucleotides, which may either be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA.

The term "polypeptides" denotes peptides or proteins that contain two or more amino acids bound via peptide bonds.

The polypeptides according to the invention include a 20 polypeptide according to SEQ ID No. 2, in particular those peptides having the biological activity of lysR1 protein, and also those polypeptides that are at least 70%, preferably at least 80% and particularly preferably at least 90% to 95% identical to the polypeptide according to 25 SEQ ID No. 2 and have the aforementioned activity.

The present invention furthermore relates to a process for the enzymatic production of amino acids, in particular L-lysine, using coryneform bacteria that in particular already produce amino acids and in which the nucleotide 30 sequences coding for the lysR1 gene are attenuated, in particular are switched off or are expressed at a low level.

- The term "attenuation" used in this context denotes the reduction or switching off of the intracellular activity of one or more enzymes (proteins) in a microorganism that are
- 5 coded by the corresponding DNA, by for example using a weak promoter or using a gene or allele that codes for a corresponding gene having a low activity or that inactivates the corresponding gene or enzyme (protein), and optionally combining these measures.
- 10 The microorganisms that are the subject of the present invention may produce amino acids, in particular L-lysine, from glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch, cellulose or from glycerol and ethanol. These microorganisms may be representatives of coryneform
- 15 bacteria, in particular of the genus *Corynebacterium*. In the genus *Corynebacterium* the species *Corynebacterium glutamicum* should in particular be mentioned, which is known to those skilled in the art for its ability to produce L-amino acids.
- 20 Suitable strains of the genus *Corynebacterium*, in particular of the species *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), are in particular the known wild type strains
- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
- 25 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
- 30 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 and
Brevibacterium divaricatum ATCC14020
- or mutants or strains formed therefrom that produce L-amino acids, such as for example the strains producing L-lysine.

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
5 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1
Corynebacterium glutamicum DG52-5
Corynebacterium glutamicum DSM 5714 and
Corynebacterium glutamicum DSM 12866

- 10 The inventors have successfully isolated the new lysR1 gene from C. glutamicum coding for lysR1 protein, which is a transcription regulator of the lysR family.

In order to isolate the lysR1 gene or also other genes from C. glutamicum, a gene library of this microorganism is 15 first of all introduced into Escherichia coli (E. coli). The introduction of gene libraries is described in generally known textbooks and manuals. As an example there may be mentioned the textbook by Winnacker: Gene and Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990), or the manual by Sambrook et al.: 20 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A very well-known gene library is that of the E. coli K-12 strain W3110, which was introduced by Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) into λ-vectors. 25 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) describe a gene library of C. glutamicum ATCC13032, which was introduced by means of the cosmid vector SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) in the E. coli K-12 strain 30 NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575). Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) again describe a gene library of C. glutamicum ATCC13032 using the cosmid pHC79 (Hohn and Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

In order to produce a gene library of *C. glutamicum* in *E. coli* there may also be used plasmids such as pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) or pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268). Suitable hosts are in particular those *E. coli* strains that are restriction and recombinant defective, such as for example the strain DH5 α , (Jeffrey H. Miller: "A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)

The long DNA fragments cloned with the help of cosmids or other λ -vectors may then in turn be subcloned into conventional vectors suitable for DNA sequencing.

Methods of DNA sequencing are described in, *inter alia*, Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977).

The DNA sequences obtained may then be investigated with known algorithms or sequence analysis programs, such as for example that of Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), that of Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) or the GCG program of Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)).

The new DNA sequence of *C. glutamicum* coding for the lysR1 gene was obtained in this way, and as SEQ ID No. 1 is part of the present invention. The amino acid sequence of the corresponding protein was also derived from the existing DNA sequence using the aforescribed methods. The resulting amino acid sequence of the lysR1 gene product is shown in SEQ ID No. 2.

Coding DNA sequences that are obtained from SEQ ID No. 1 as a result of the degenerability of the genetic code are also covered by the invention. Similarly, DNA sequences that

hybridise with SEQ ID No. 1 or parts of SEQ ID No. 1 are also covered by the invention. Furthermore, in this specialist field conservative amino acid replacements, such as for example the replacement of glycine by alanine or of 5 aspartic acid by glutamic acid in proteins, are known as sense mutations, which do not lead to any fundamental change in the activity of the protein, i.e. are functionally neutral. Furthermore, it is known that changes at the N-terminus and/or C-terminus of a protein do 10 not significantly impair or may even stabilise its function. Those skilled in the art can find details of this in, *inter alia*, Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), in O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), in Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 15 3:240-247 (1994)), in Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) and in known textbooks of genetics and molecular biology. Amino acid sequences that are obtained in a corresponding manner from SEQ ID No. 2 are likewise covered by the invention.

20 Finally, DNA sequences that are produced by the polymerase chain reaction (PCR) using primers resulting from SEQ ID No. 1, are also covered by the invention. Such oligonucleotides typically have a length of at least 15 nucleotides.

25 The person skilled in the art can find details of the identification of DNA sequences by means of hybridisation in, *inter alia*, the textbook "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" published by Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany, 1993) and in Liebl et al.

30 (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). The person skilled in the art can obtain details of the amplification of DNA sequences by means of the polymerase chain reaction (PCR) in, *inter alia*, the handbook by Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical 35 Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) and the Newton and

Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, 1994).

In the course of work carried out on the present invention it was found that coryneform bacteria after attenuation of 5 the lysR1 gene produce amino acids, in particular L-lysine, in an improved manner.

In order to achieve an attenuation, either the expression of the lysR1 gene or the catalytic properties of the enzyme protein may be reduced or switched off. Optionally both 10 measures may be combined.

The reduction of the gene expression may be achieved by suitable culture conditions or by genetic alteration (mutation) of the signal structures of the gene expression. Signal structures of the gene expression are for example 15 repressor genes, activator genes, operators, promoters, attenuators, ribosome binding sites, the start codon and terminators. The person skilled in the art can obtain further information on this in for example patent application WO 96/15246, in Boyd and Murphy (Journal of 20 Bacteriology 170: 5949 (1988)), in Voskuil and Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998), in Jensen and Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), in Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) and in 25 known textbooks of genetics and molecular biology, such as for example the textbook by Knippers ("Molekulare Genetik", 6th Edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995) or the textbook by Winnacker ("Gene and Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990).

30 Mutations that lead to an alteration or reduction of the catalytic properties of enzyme proteins are known in the prior art; as examples there may be mentioned the work of Qiu and Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and

- Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) and Möckel ("Die Threonindehydrolase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms", and reports published by the Jülich Research Centre, Jülich-2906, ISSN09442952, Jülich, Germany, 1994). Overviews may be obtained from known textbooks on genetics and molecular biology, for example that of Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).
- 10 Mutations in the present context include transitions, transversions, insertions and deletions. Depending on the effect of the amino acid replacement on the enzyme activity, one talks either of missense mutations or nonsense mutations. Insertions or deletions of at least 15 one base pair (bp) in a gene lead to frame shift mutations, following which false amino acids are incorporated or the translation terminates prematurely. Deletions of several codons typically lead to a complete cessation of enzyme activity. Details of the production of such mutations are 20 part of the prior art and may be obtained from known textbooks on genetics and molecular biology, such as for example the textbook by Knippers ("Molekulare Genetik", 6th Edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995), the textbook by Winnacker ("Gene and Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990) or the 25 textbook by Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

A conventional method of mutating genes of *C. glutamicum* is the method of gene disruption and gene replacement 30 described by Schwarzer and Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)).

In the method of gene disruption a central part of the coding region of the gene in question is cloned into a plasmid vector that can replicate in a host (typically *E. coli*), but not in *C. glutamicum*. Suitable vectors are for 35

example pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob or pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB or pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994), Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Invitrogen, Groningen, Netherlands; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) or pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516). The plasmid vector that contains the central part of the coding region of the gene is then converted by conjugation or transformation into the desired strain of *C. glutamicum*. The method of conjugation is described for example by Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)). Methods of transformation are described for example in Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican and Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) and Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)). After homologous recombination by means of a cross-over event, the coding region of the relevant gene is disrupted by the vector sequence and two incomplete alleles are obtained, missing respectively the 3'- and 5'-end. This method has been used for example by Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) to switch off the recA gene of *C. glutamicum*.

Fig. 1 shows for example the plasmid vector pCR2.1 lysR1int, by means of which the lysR1 gene can be disrupted or switched off.

In the gene replacement method a mutation, such as for example a deletion, insertion or base replacement, is produced *in vitro* in the gene that is of interest. The resultant allele is in turn cloned into a non-replicative vector for *C. glutamicum*, and this is then converted by

transformation or conjugation into the desired host of C. glutamicum. After homologous recombination by means of a first cross-over event effecting integration, and an appropriate second cross-over event effecting an excision,
5 the incorporation of the mutation or allele in the target gene or in the target sequence is achieved. This method has been used for example by Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) to switch off the pyc gene of C. glutamicum by a deletion.

- 10 A deletion, insertion or a base replacement can be incorporated into the lysR1 gene in this way.

In addition, it may be advantageous for the production of L-amino acids, in particular L-lysine, in addition to the attenuation of the lysR1 gene, also to enhance, in
15 particular overexpress, one or more enzymes of the respective biosynthesis pathway, glycolysis, anapleurosis, pentose phosphate cycle, or amino acid export.

Thus for example, for the production of L-lysine one or more of the genes selected from the following group may
20 simultaneously be enhanced, in particular overexpressed

- the gene dapA coding for dihydrodipicolinate synthase (EP-B 0 197 335),
- the gene eno coding for enolase (DE: 19947791.4),
- the gene zwf coding for the zwf gene product (JP-A-
25 09224661),
- the gene pyc coding for pyruvate carboxylase (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)))
- the gene lysE coding for lysine export (DE-A-195 48 222).

Also, it may be advantageous for the production of amino acids, especially L-lysine, besides attenuating the lysR1 gene, at the same time to attenuate one or more of the genes selected from the group

- 5 • the gene *pck* coding for phosphoenol pyruvate carboxykinase (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
 • the gene *pgi* coding for glucose-6-phosphate isomerase (US 09/396,478, DSM 12969),
 • the gene *poxB* coding for pyruvate oxidase
10 (DE:1995 1975.7, DSM 13114)

Moreover, it may be advantageous for the production of amino acids, in particular L-lysine, in addition to attenuating the *lysR1* gene also to switch off undesirable secondary reactions (Nakayama: "Breeding of Amino Acid

15 Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sickyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

The microorganisms produced according to the invention are likewise covered by the invention and for the purposes of

20 producing L-amino acids, in particular L-lysine, may be cultivated continuously or batchwise in a batch process, or in a feed batch process or repeated batch process. A summary of known cultivation methods is described in the textbook by Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrens-technik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) or in the textbook by Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)).

The culture medium to be used must satisfy in an appropriate manner the requirements of the respective strains. Descriptions of culture media for various microorganisms are given in the handbook "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for

Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). As carbon source there may be used sugars and carbohydrates such as for example glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch and cellulose, oils and fats such as for example soya oil, sunflower oil, groundnut oil and coconut oil, fatty acids such as for example palmitic acid, stearic acid and linoleic acid, alcohols such as for example glycerol and ethanol, and organic acids such as for example acetic acid. These substances may be used individually or 10 as a mixture.

As nitrogen source there may be used organic nitrogen-containing compounds such as peptones, yeast extract, meat extract, malt extract, corn steep liquor, soya bean flour and urea, or inorganic compounds such as ammonium sulfate, 15 ammonium chloride, ammonium phosphate, ammonium carbonate and ammonium nitrate. The nitrogen sources may be used individually or as a mixture.

As phosphorus source there may be used phosphoric acid, potassium dihydrogen phosphate or dipotassium hydrogen phosphate, or the corresponding sodium-containing salts. 20 The culture medium must furthermore contain salts of metals, such as for example magnesium sulfate or iron sulfate, that are necessary for growth. Finally, essential growth promoters such as amino acids and vitamins may in 25 addition be added to the aforementioned substances.

Suitable precursors may moreover be added to the culture medium. The aforementioned starting substances may be added to the culture in the form of a single batch, or metered in in an appropriate manner during the cultivation 30 procedure.

In order to control the pH of the culture basic compounds such as sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonia or ammonia water, or acidic compounds such as phosphoric acid or sulfuric acid may be added in an appropriate manner. In 35 order to control foam formation anti-foaming agents such as

for example fatty acid polyglycol esters may be used. In order to maintain the stability of plasmids selectively acting substances, such as for example antibiotics, may be added to the medium. In order to maintain aerobic 5 conditions, oxygen or oxygen-containing gas mixtures, such as for example air, are pumped into the culture. The temperature of the culture is normally 20°C to 45°C and preferably 25°C to 40°C. The cultivation is continued until a maximum amount of the desired product has been 10 formed. This target is normally reached within 10 hours to 160 hours.

Methods for determining L-amino acids are known from the prior art. The analysis may for example be carried out as described by Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, 15 (1958), 1190) by anion exchange chromatography followed by ninhydrin derivatisation, or it may be carried out by reversed phase HPLC, as described by Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174).

The following microorganism has been filed according to the 20 Budapest Convention at the German Collection for Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Brunswick, Germany).

- Escherichia coli strain E. coli TOP10F/pCR2.1lysR1int as DSM 13616.
- 25 The process according to the invention serves for the enzymatic production of amino acids, in particular L-lysine.

The present invention is illustrated in more detail hereinafter with the aid of examples of implementation.

- 30 The isolation of plasmid DNA from Escherichia coli as well as all techniques for the restriction, Klenow and alkaline phosphatase treatment were carried out according to Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual,

1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA). Methods for the transformation of *Escherichia coli* are likewise described in this handbook.

5 The compositions of conventional nutrient media such as LB medium or TY medium may also be obtained from the handbook by Sambrook et al.

Example 1

Production of a genomic cosmid gene library from *C. glutamicum* ATCC 13032

10 Chromosomal DNA from *C. glutamicum* ATCC 13032 was isolated as described by Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) and partially cleaved with the restriction enzyme Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description Sau3AI, Code no. 27-0913-02). The DNA fragments were
15 dephosphorylated with shrimp alkaline phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, Product Description SAP, Code no. 1758250). The DNA of the cosmid vector SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), obtained
20 from Stratagene (La Jolla, USA, Product Description SuperCos1 Cosmid Vector Kit, Code no. 251301) was cleaved with the restriction enzyme XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description XbaI, Code no. 27-0948-02) and likewise dephosphorylated with shrimp alkaline
25 phosphatase.

The cosmid DNA was then cleaved with the restriction enzyme BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description BamHI, Code no. 27-0868-04). The cosmid DNA treated in this way was mixed with the treated ATCC13032-
30 DNA, and the batch was then treated with T4-DNA ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description T4-DNA ligase, Code no.27-0870-04). The ligation mixture was then packed into phages using Gigapack II XL Packing

Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Product Description Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217).

In order to infect the E. coli strain NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) the cells were taken up in 10 mM MgSO₄ and mixed with an aliquot of the phage suspension. Infection and titration of the cosmid library were carried out as described by Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor), the cells being plated out on LB agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml ampicillin. After incubation overnight at 37°C recombinant individual clones were selected.

Example 2

Isolation and sequencing of the gene lysR1

The cosmid DNA of an individual colony was isolated with the Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and then partially cleaved with the restriction enzyme Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description Sau3AI, Product No. 27-0913-02). The DNA fragments were dephosphorylated with shrimp alkaline phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, Product Description SAP, Product No. 1758250). After gel electrophoresis separation the cosmid fragments were isolated in the size range from 1500 to 2000 bp using the QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

The DNA of the sequencing vector pZero-1 obtained from Invitrogen (Groningen, Netherlands, Product Description Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) was cleaved with the restriction enzyme BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description BamHI, Product No. 27-0868-04). The ligation of the cosmid

fragments into the sequencing vector pZero-1 was carried out as described by Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor), the DNA mixture having been incubated overnight with T4 ligase 5 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). This ligation mixture was then electroporated into the E. coli strain DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) and plated out onto LB-agar 10 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) with 50 μ g/l zeocin.

The plasmid preparation of the recombinant clone was carried out with the Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Germany). The sequencing was performed according to the dideoxy chain termination method of Sanger 15 et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) as modified by Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). The "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" from PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Germany) was 20 used. The gel electrophoresis separation and analysis of the sequencing reaction were carried out in a "Rotiphoresis NF Acrylamide/Bisacrylamide" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) using the "ABI Prism 377" sequencing device from PE Applied Biosystems (Weiterstadt, 25 Germany).

The raw sequence data thus obtained were then processed using the Staden Program Package (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0. The individual sequences of the pZerol derivates were assembled to form a 30 coherent contig. The computer-assisted coding region analysis was prepared using the XNIP program (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231). Further analyses were carried out with the "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) against the

non-redundant database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

The nucleotide sequence thus obtained is represented in SEQ ID No. 1. Analysis of the nucleotide sequence revealed an 5 open reading frame of 912 base pairs, which was termed the lysR1 gene. The lysR1 gene codes for a polypeptide of 304 amino acids.

Example 3

Production of an integration vector for the integration 10 mutagenesis of the lysR1 gene

Chromosomal DNA was isolated from the strain ATCC 13032 by the method of Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)). On account of the sequence of the lysR1 gene known from Example 2 for C. glutamicum, the following 15 oligonucleotides were selected for the polymerase chain reaction:

lysR1intA:
5`TTC CAA TCC CTG CTG TTC AC 3`

lysR1intB:
20 5`GTG ACC TTT GAA ACC AGC GA 3`

The represented primers were synthesised by MWG Biotech (Ebersberg, Germany) and the PCR reaction was carried out according to the standard PCR method of Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, 25 Academic Press) using Pwo polymerase from Boehringer. By means of the polymerase chain reaction a 383 bp long internal fragment of the lysR1 gene was isolated, which is shown in SEQ ID No. 3.

The amplified DNA fragment was ligated into the vector 30 pCR2.1-TOPO (Mead at al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) using the TOPO TA Cloning Kit from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Cat. No. K4500-01).

The E. coli strain TOP10F was then transformed with the ligation batch (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985). Plasmid-carrying cells were selected by plating out 5 the transformation batch onto LB agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) that had been supplemented with 25 mg/l of kanamycin. Plasmid DNA was isolated from a transformant using the 10 QIAprep Spin Miniprep Kit from Qiagen and was checked by restriction with the restriction enzyme EcoRI followed by agarose gel electrophoresis (0.8%). The plasmid was named pCR2.1lysR1int.

Example 4

15 Integration mutagenesis of the lysR1 gene in the lysine producer DSM 5715

The vector pCR2.1lysR1int mentioned in Example 3 was electroporated into Corynebacterium glutamicum DSM 5715 according to the electroporation method of Tauch et. 20 al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)). The strain DSM 5715 is an AEC-resistant lysine producer. The vector pCR2.1lysR1int cannot replicate independently in DSM 5715 and thus only remains in the cell if it has integrated 25 into the chromosome of DSM 5715. The selection of clones with pCR2.1lysR1int integrated into the chromosome was made by plating out the electroporation batch onto LB agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) that had been supplemented with 15 mg/l of 30 kanamycin.

In order to demonstrate the integration the lysR1int fragment was labelled using the Dig Hybridisation Kit from Boehringer according to the method described in "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" published by

Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany, 1993). Chromosomal DNA of a potential integrant was isolated according to the method of Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) and was in each case cleaved with 5 the restriction enzymes SalI, SacI and HindIII. The resultant fragments were separated by means of agarose gel electrophoresis and hybridised at 68°C using the Dig Hybridisation Kit from Boehringer. The plasmid pCR2.1lysR1int mentioned in Example 3 had inserted itself 10 into the chromosome of DSM 5715 within the chromosomal lysR1 gene. The strain was designated DSM 5715::pCR2.1lysR1int.

Example 5

Production of lysine

15 The C. glutamicum strain DSM 5715::pCR2.1lysR1int obtained in Example 4 was cultivated in a nutrient medium suitable for the production of lysine and the lysine content in the culture supernatant was determined.

For this purpose the strain was first of all incubated for 20 24 hours at 33°C on an agar plate with the corresponding antibiotic (brain-heart agar with kanamycin (25 mg/l). Starting from this agar plate culture a preculture was inoculated (10 ml of medium in a 100 ml Erlenmeyer flask). The full medium CgIII was used as medium for the 25 preculture.

Medium Cg III

NaCl 2.5 g/l

Bacto-Peptone 10 g/l

Bacto-Yeast Extract 10 g/l

Glucose (autoclaved separately) 2% (w/v)

The pH value was adjusted to pH
7.4

Kanamycin (25 mg/l) was added to this preculture. The preculture was then incubated for 24 hours at 33°C at 240 rpm on a shaker table. From this preculture a main culture was inoculated so that the initial OD (660 nm) of the main culture was 0.1 OD. The medium MM was used for the main culture.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS 20 g/l

Glucose (autoclaved separately) 50g/l

Salts:

(NH₄)₂SO₄) 25 g/l

KH₂PO₄ 0.1 g/l

MgSO₄. 7H₂O 1.0 g/l

CaCl₂. 2H₂O 10 mg/l

FeSO₄. 7H₂O 10 mg/l

MnSO₄. H₂O 5.0 mg/l

Biotin (sterile filtered) 0.3 mg/l

Thiamine.HCl (sterile filtered) 0.2 mg/l

Leucine (sterile filtered) 0.1 g/l

CaCO₃ 25 g/l

CSL, MOPS and the salt solution are adjusted with ammonia water to pH 7 and autoclaved. The sterile substrate and

vitamin solutions as well as the dry autoclaved CaCO₃ are then added.

Cultivation is carried out in a 10 ml volume in a 100 ml Erlenmeyer flask equipped with baffles. Kanamycin was added 5 (25 mg/l). The cultivation was carried out at 33°C and 80% atmospheric humidity.

After 72 hours the OD was determined at a measurement wavelength of 660 nm with a Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, Munich). The amount of lysine formed was 10 determined by ion exchange chromatography and post-column derivatisation with ninhydrin detection using an amino acid analyser from Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Germany).

The results of the experiment are shown in Table 1.

Table 1

| Strain | OD(660) | Lysine-HCl g/l |
|---------------------------|---------|----------------|
| DSM 5715 | 7.5 | 13.01 |
| DSM 5715:: pCR2.1lysR1int | 7.7 | 15.64 |

SEQUENCE PROTOCOL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> New nucleotide sequences coding for the lysR1 gene

<130> 000179 BT

<140>

10 <141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1311

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>

<221> CDS

<222> (201)..(1109)

<223> lysR1 gene

25 <400> 1

acagcccagg ggccgttgag ggggaaaagc tgcgttccaa tggcagcacc aaattgcagg 60

gatagggcgg aaccatcac catcaacact gcagcggact gtttattcat gcccttgatt 120

30 attgccaaag aaaccttaa ggactagatc gaaaaacagc caactatagt taagtaatac 180

tgaacaattt tggaggtgtc gtg ctc aat ctc aac cgc tta cac atc ctg cag 233
Met Leu Asn Leu Asn Arg Leu His Ile Leu Gln
1 5 1035 gaa ttc cac cgc ctg gga acg att aca gca gtg gcg gaa tcc atg aac 281
Glu Phe His Arg Leu Gly Thr Ile Thr Ala Val Ala Glu Ser Met Asn
15 20 2540 tac agc cgc tct gcc atc tcc caa caa atg gcg ctg ctg gaa aaa gaa 329
Tyr Ser Arg Ser Ala Ile Ser Gln Gln Met Ala Leu Leu Glu Lys Glu
30 35 4045 att ggt gtg aaa ctc ttt gaa aaa agc ggc cga aac ctc tac ttc aca 377
Ile Gly Val Lys Leu Phe Glu Lys Ser Gly Arg Asn Leu Tyr Phe Thr
45 50 5550 gaa caa ggc gaa gtg ttg gcc tca gaa aca cat gcg atc atg gca gca 425
Glu Gln Gly Glu Val Leu Ala Ser Glu Thr His Ala Ile Met Ala Ala
60 65 70 7555 gtc gac cat gcc cgc gca gcc gtt cta gat tcg ctg tct gaa gtg tcc 473
Val Asp His Ala Arg Ala Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Val Ser
80 85 90gga acg ctg aaa gtc acc tcc ttc caa tcc ctg ctg ttc acc ctt gcc 521
Gly Thr Leu Lys Val Thr Ser Phe Gln Ser Leu Leu Phe Thr Leu Ala
95 100 105

| | | |
|----|---|------|
| | ccg aaa gcc atc gcg cgc ctg acc gag aaa tac cca cac ctg caa gta | 569 |
| | Pro Lys Ala Ile Ala Arg Leu Thr Glu Lys Tyr Pro His Leu Gln Val | |
| | 110 115 120 | |
| 5 | gaa atc tcc caa cta gaa gtc acc gca gcg ctc gaa gaa ctc cgc gcc | 617 |
| | Glu Ile Ser Gln Leu Glu Val Thr Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg Ala | |
| | 125 130 135 | |
| 10 | cgc cgc gtc gac gtc gca ctc ggc gag gaa tac ccc gtg gaa gtc ccc | 665 |
| | Arg Arg Val Asp Val Ala Leu Gly Glu Tyr Pro Val Glu Val Pro | |
| | 140 145 150 155 | |
| 15 | ctt gtt gag gcc agc att cac cgc gaa gtc ctc ttc gaa gac ccc atg | 713 |
| | Leu Val Glu Ala Ser Ile His Arg Glu Val Leu Phe Glu Asp Pro Met | |
| | 160 165 170 | |
| 20 | ctg ctc acc cca gca agc ggc cca tac tct ggc ctc acc ctg cca | 761 |
| | Leu Leu Val Thr Pro Ala Ser Gly Pro Tyr Ser Gly Leu Thr Leu Pro | |
| | 175 180 185 | |
| | gaa ctc cgc gac atc ccc atc gcc atc gat cca ccc gac ctt ccc gcg | 809 |
| | Glu Leu Arg Asp Ile Pro Ile Ala Ile Asp Pro Pro Asp Leu Pro Ala | |
| | 190 195 200 | |
| 25 | ggc gaa tgg gtc cat agg ctc tgc cgg cgc gcc ggg ttt gag ccc cgc | 857 |
| | Gly Glu Trp Val His Arg Leu Cys Arg Arg Ala Gly Phe Glu Pro Arg | |
| | 205 210 215 | |
| 30 | gtg acc ttt gaa acc agc gat ccc atg ctc caa gca cac ctc gtg cgt | 905 |
| | Val Thr Phe Glu Thr Ser Asp Pro Met Leu Gln Ala His Leu Val Arg | |
| | 220 225 230 235 | |
| 35 | agc ggc ttg gcc gtg aca ttt tcc ccc aca ctg ctc acc ccg atg ctg | 953 |
| | Ser Gly Leu Ala Val Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Thr Pro Met Leu | |
| | 240 245 250 | |
| 40 | gaa agc gtg cac atc cag ccg ctg ccc ggc aac ccc acg cgc acg ctc | 1001 |
| | Glu Ser Val His Ile Gln Pro Leu Pro Gly Asn Pro Thr Arg Thr Leu | |
| | 255 260 265 | |
| | tac acc gcg gtc agg gaa ggg cgc cag ggg cat cca gcc att aaa gct | 1049 |
| | Tyr Thr Ala Val Arg Glu Gly Arg Gln Gly His Pro Ala Ile Lys Ala | |
| | 270 275 280 | |
| 45 | ttt cga cga gcc ctc gcc cat gtg gcc aaa gaa tct tat ttg gag gct | 1097 |
| | Phe Arg Arg Ala Leu Ala His Val Ala Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Ala | |
| | 285 290 295 | |
| 50 | cgt cta gta gag tgagttcttg tgaggcattca gacaaatcat cgcccagtac | 1149 |
| | Arg Leu Val Glu | |
| | 300 | |
| 55 | tcgtcggtga cttcgccgca cagtagcgcg agctgatcgc acgtcgtgtg cgtgaggccg | 1209 |
| | gcatctactc cgaagtcatc ccgcacacccg ccaccgcaga cgtatgtgcgc gctaaaaatg | 1269 |
| | cagcagccct cgtcctttcc ggtggcccat cctccgtgta tg | 1311 |

<210> 2
 <211> 303
 <212> PRT
 5 <213> Corynebacterium glutamicum

| | |
|----|---|
| | <400> 2 |
| | Met Leu Asn Leu Asn Arg Leu His Ile Leu Gln Glu Phe His Arg Leu |
| | 1 5 10 15 |
| 10 | Gly Thr Ile Thr Ala Val Ala Glu Ser Met Asn Tyr Ser Arg Ser Ala |
| | 20 25 30 |
| 15 | Ile Ser Gln Gln Met Ala Leu Leu Glu Lys Glu Ile Gly Val Lys Leu |
| | 35 40 45 |
| | Phe Glu Lys Ser Gly Arg Asn Leu Tyr Phe Thr Glu Gln Gly Glu Val |
| | 50 55 60 |
| 20 | Leu Ala Ser Glu Thr His Ala Ile Met Ala Ala Val Asp His Ala Arg |
| | 65 70 75 80 |
| | Ala Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Val Ser Gly Thr Leu Lys Val |
| | 85 90 95 |
| 25 | Thr Ser Phe Gln Ser Leu Leu Phe Thr Leu Ala Pro Lys Ala Ile Ala |
| | 100 105 110 |
| 30 | Arg Leu Thr Glu Lys Tyr Pro His Leu Gln Val Glu Ile Ser Gln Leu |
| | 115 120 125 |
| | Glu Val Thr Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg Arg Val Asp Val |
| | 130 135 140 |
| 35 | Ala Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Val Glu Val Pro Leu Val Glu Ala Ser |
| | 145 150 155 160 |
| | Ile His Arg Glu Val Leu Phe Glu Asp Pro Met Leu Leu Val Thr Pro |
| | 165 170 175 |
| 40 | Ala Ser Gly Pro Tyr Ser Gly Leu Thr Leu Pro Glu Leu Arg Asp Ile |
| | 180 185 190 |
| 45 | Pro Ile Ala Ile Asp Pro Pro Asp Leu Pro Ala Gly Glu Trp Val His |
| | 195 200 205 |
| | Arg Leu Cys Arg Arg Ala Gly Phe Glu Pro Arg Val Thr Phe Glu Thr |
| | 210 215 220 |
| 50 | Ser Asp Pro Met Leu Gln Ala His Leu Val Arg Ser Gly Leu Ala Val |
| | 225 230 235 240 |
| | Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Thr Pro Met Leu Glu Ser Val His Ile |
| | 245 250 255 |
| 55 | Gln Pro Leu Pro Gly Asn Pro Thr Arg Thr Leu Tyr Thr Ala Val Arg |
| | 260 265 270 |
| | Glu Gly Arg Gln Gly His Pro Ala Ile Lys Ala Phe Arg Arg Ala Leu |

275

280

285

Ala His Val Ala Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Ala Arg Leu Val Glu
290 295 300

5

<210> 3

<211> 383

10 <212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> lysRlint-Fragment

15 <400> 3

ttccaaatccc tgctgttcac ccttgccccg aaagccatcg cgccgcctgac cgagaaaatac 60
ccacacctgc aagttagaaat ctcccaacta gaagtcaccg cagcgctcga agaactccgc 120
gcccggcgcg tcgacgtcgc actcggcgag gaataccccg tggaaagtccc ccttgtttag 180
20 gccagcattc accgcgaagt cctcttcgaa gaccccatgc tgctcgatcac cccagcaago 240
ggcccaatact ctggccctcac cctgccagaa ctccgcgaca tccccatcgc catcgatcca 300
cccgaccttc ccgcgggcga atgggtccat aggctctgcc ggccgcgcgg gtttgagccc 360
cgcgtgacct ttgaaaccag cga 383

The following figures are enclosed:

Fig. 1: Map of the plasmid pCR2.1lysR1int.

The acronyms and abbreviations used have the following meanings.

KmR: Kanamycin resistance gene

EcoRI: Cleavage site of the restriction enzyme
EcoRI

lysR1int: Internal fragment of the lysR1 gene

ColE1 ori: Replication origin of the plasmid ColE1

Patent Claims

1. An isolated polynucleotide from coryneform bacteria containing a polynucleotide sequence coding for the lysR1 gene, selected from the group comprising
 - a) polynucleotide that is at least 70% identical to a polynucleotide coding for a polypeptide that contains the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
 - b) polynucleotide coding for a polypeptide that contains an amino acid sequence that is at least 70% identical to the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
 - c) polynucleotide that is complementary to the polynucleotides of a) or b), and
 - d) polynucleotide containing at least 15 successive nucleotides of the polynucleotide sequence of a), b) or c),
the polypeptide preferably having the activity of the transcription regulator lysR1.
- 20 2. A polynucleotide as claimed in claim 1, wherein the polynucleotide is a preferably recombinant DNA replicable in coryneform bacteria.
3. A polynucleotide as claimed in claim 1, wherein the polynucleotide is an RNA.
- 25 4. Replicable DNA as claimed in claim 2, containing
 - (i) the nucleotide sequence shown in SEQ ID No. 1, or
 - (ii) at least one sequence that corresponds to the sequence (i) within the region of degeneration of the genetic code, or

(iii) at least one sequence that hybridises with the sequences complementary to the sequences (i) or (ii), and optionally

(iv) functionally neutral sense mutations in (i).

5 5. A polynucleotide as claimed in claim 2, containing the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID No. 1.

6. Coryneform bacteria in which the lysR1 gene is attenuated, preferably switched off.

7. A process for the production of L-amino acid, in

10 particular L-lysine, wherein the following steps are carried out:

a) fermentation of the bacteria producing the desired L-amino acid, in which at least the lysR1 gene is attenuated,

15 b) accumulation of the desired product in the medium or in the cells of the bacteria, and

c) isolation of the L-amino acid.

8. A process as claimed in claim 7, wherein bacteria are used in which in addition further genes of the

20 biosynthesis pathway of the desired L-amino acid are enhanced.

9. A process as claimed in claim 7, wherein bacteria are used in which the metabolic pathways that reduce the formation of the desired L-amino acid are at least partially switched off.

25 10. A process as claimed in claim 7, wherein the expression of the polynucleotide(s) that codes/code for the lysR1 gene is attenuated, in particular is switched off.

11. A process as claimed in claim 7, wherein the regulatory properties of the polypeptide that codes for the polynucleotide lysR1 codes are reduced.

12. A process as claimed in claim 7, wherein for the production of L-amino acids, in particular L-lysine, bacteria are fermented in which simultaneously one or more of the genes selected from the following group is/are enhanced, preferably overexpressed.

10 12.1 The gene dapA coding for dihydridipicolinate synthase,

12.2 the gene eno coding for enolase,

12.3 the gene zwf coding for the zwf gene product,

12.4 the gene pyc coding for pyruvate carboxylase,

12.5 the gene lysE coding for lysine export.

15 13. A process as claimed in claim 7, wherein one or more of the genes selected from the following group is simultaneously attenuated:

13.1 the gene pck coding for phosphoenol pyruvate carboxykinase

20 13.2 the gene pgi coding for glucose-6-phosphate isomerase

13.3 the gene poxB coding for pyruvate oxidase.

14. A process as claimed in one or more of the preceding claims, wherein microorganisms of the species Corynebacterium glutamicum are used.

25 15. A process for detecting RNA, cDNA and DNA in order to isolate nucleic acids, polynucleotides or genes that code for the transcription regulator lysR1 or that have a high degree of affinity to the sequence of the

lysR1 gene, wherein the polynucleotide sequences as claimed in claims 1 to 4 are used as hybridisation probes.

New Nucleotide Sequences Coding for the lysR1 Gene**Abstract**

Isolated polynucleotide containing a polynucleotide sequence selected from the group

- 5 a) polynucleotide that is at least 70% identical to a polynucleotide coding for a polypeptide that contains the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
- 10 b) polynucleotide coding for a polypeptide that contains an amino acid sequence that is at least 70% identical to the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
- c) polynucleotide that is complementary to the polynucleotides of a) or b), and
- 15 d) polynucleotide containing at least 15 successive nucleotides of the polynucleotide sequence of a), b) or c),

and a process for the enzymatic production of L-amino acids using coryneform bacteria in which at least the lysR1 gene is present in attenuated form, and the use of the polynucleotide sequences as hybridisation probes.

Fig. 1: Plasmid Map of pCR2.1lysR1int

